

絹糸腺無細胞系での絹フィブロイン生合成に関する研究

著者	江尻 慎一郎
号	50
発行年	1968
URL	http://hdl.handle.net/10097/12431

氏 名 (本籍) え 江 じり 尻 しん いち ろう 慎 一 郎 (福島県)

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 博 第 5 0 号

学位授与年月日 昭和 4 3 年 6 月 1 3 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

研 究 科 専 攻 東北大学大学院 農学研究科
(博士課程) 農芸化学専攻

学 位 論 文 題 目 絹糸腺無細胞系での絹フィブロイン
生合成に関する研究

(主 査)
論文審査委員 教授 志 村 憲 助 教授 玉 利 勤 治 郎

教授 高 橋 甫

論文内容要旨

第一章 緒 論

現時点に立って、各種生物で得られた蛋白合成の膨大な研究を眺めて見ると、蛋白合成反応の諸因子がばらばら出そろったといっても過言ではない。次の段階として、これらの諸因子を試験管内で再構成して蛋白合成反応を進行させる際に、それらの諸因子がそれぞれの様な働きを演じているかを明らかにせねばならない。しかし、蛋白質合成の最終段階の反応には、リボソーム、mRNA、各種アミノアシル-sRNA、2種以上の酵素およびGTP等の因子が存在し、複雑な相互作用を行っていることが予測される。GTPの蛋白合成における作用機作ひとつに関しても、多くの説は出されつつあるが依然として仮説の域を出ない。

蛋白質生合成研究に関する上のような現状を背景とし、著者は、カイコの後部絹糸腺を用い、無細胞フィブリン合成系の確立および反応系に必要な諸因子の解析といった、分析的、静的な段階から、フィブリン合成に必要な各因子間の相互作用およびペプチド結合の生成といったより動的な段階へと、異種生物の蛋白合成系と対比しながら研究を進めた。

論文は六章よりなる。第一章では、研究の意義および目的を述べ、さらに、カイコ絹糸腺以外の生物種について得られた現在までの蛋白質合成に関する研究結果を総説した。第二章にアミノアシル-sRNA形成反応について述べ、以下の第三章より第五章にわたって、アミノアシル-sRNAからのフィブリン合成に関し、系の確立、二種類以上の酵素の関与、GTPの作用機構、反応の各種特異性および各種因子の相互作用について検討した。第六章において、得られた結果について総括的に考察し、フィブリン合成の機作について言及した。

第二章 絹糸腺 sRNA の特徴およびアミノアシル-sRNA 生成反応

フィブリンのアミノ酸組成はグリシン43%、アラニン32%、セリン15%、チロシン12%の順に含まれており、これらのアミノ酸で全アミノ酸の90%以上を占める特殊な蛋白質である。まず最初に興味ある問題は、絹糸腺sRNAの各アミノ酸に対する分布が、フィブリンの合成を反映しているか否かである。後部絹糸腺sRNAを各種¹⁴C-アミノ酸でラベルした結果、グリシン、アラニン、セリン、チロシンの順にとりかこまれフィブリンのアミノ酸組成を反映していることが明らかとなり、合成される蛋白質と各アミノ酸に対するsRNAの含量との相関関係を明確にした。

また、本章では、絹糸腺の系におけるアミノアシル-sRNA生成の基本的条件を明らかにし、さらに、カイコのアミノアシル-sRNA生成系と大腸菌、ラッテ肝、酵母等の系との種特異性を検討した。その結果、異った生物のsRNAとアミノアシルRNA合成酵素を組合わせたときより高い活性を示す、と云った特異な例も見出した。

第三章 アミノアシル-sRNAからのフィブロイン合成系の確立

絹糸腺無細胞での ^{14}C -アミノ酸からのフィブロイン合成系⁸は、鈴鹿らによりほぼ確立され、その存在が予測されていたが、アミノアシル-sRNAからのアミノ酸のとりこみを触媒する酵素であるとの証明が得られなかった酵素(アミノ酸とりこみ酵素)は、著者のその後の分離、精製により、アミノアシル-sRNA形成以後の段階に関与する酵素であることが明らかとなり、⁹「アミノ酸縮合酵素(Amino Acid Polymerase)」とした。

アミノ酸縮合酵素は非常に不安定であり精製が困難であったが、5mMの β -メルカプトエタノールおよび0.4M蔗糖の存在下で等電沈殿、硫酸分画、DEAE-celluloseカラム、Sephadex G-200およびSephacrose 4Bカラムによるゲル3過による分画等により、精製が可能となった。精製の過程において、アミノ酸縮合酵素は2つの分画に分れることが明らかとなった(図1)。この2つの分画は種々の実験結果から、両者とも酵素であることが明らかと

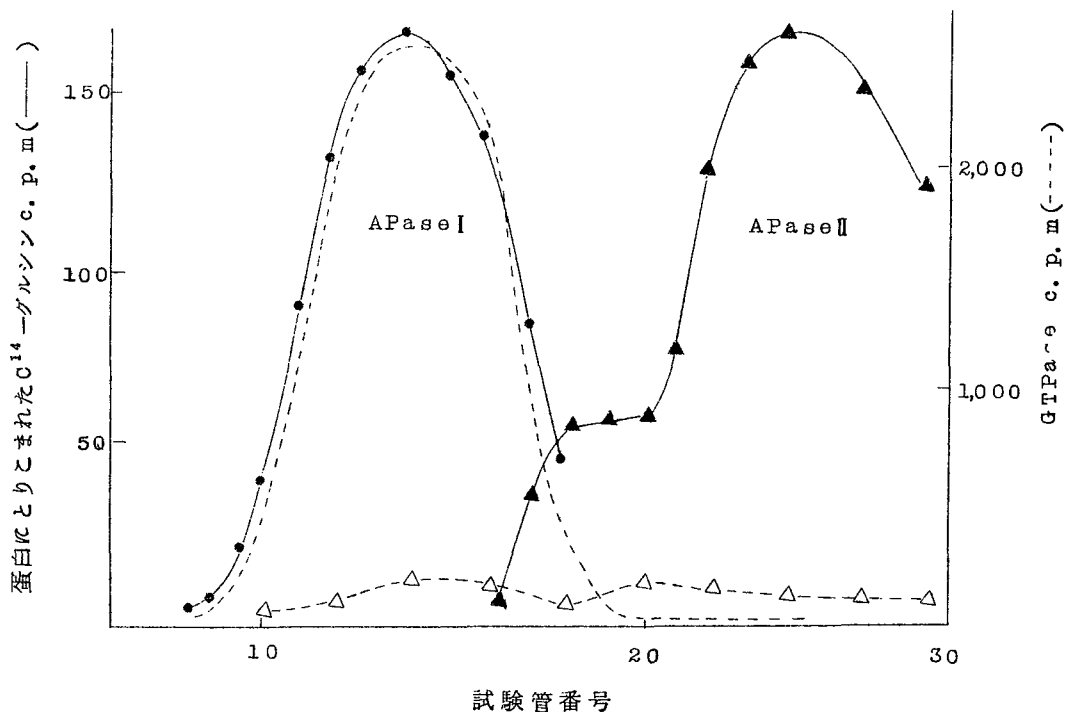


図1. Sephadex G-200カラムによるアミノ酸縮合酵素の分離

- : 各フラクション+No.24(APase II)
- ▲—▲ : 各フラクション+No.14(APase I)
- △—△ : 各フラクション単独
- : GTPase 活性

なり、アミノ酸縮合酵素ⅠおよびⅡ（APaseⅠおよびⅡ）とした。

C^{14} -アミノアシル-sRNAからのアミノ酸のとりこみはAPaseⅠおよびAPaseⅡに対する依存性が非常に顕著であり、各酵素単独ではほとんどとりこみは見られなかった。

各種 C^{14} -アミノアシル-sRNAからのアミノ酸のとりこみは、グリシン、アラニン、セリン、チロシンの順であり、用いた絹糸腺無細胞系でもフィブロインが合成されることを推定した。この推定は合成された物質の分析からも裏付けられた。アミノ酸縮合酵素Ⅰは分子量が50万であり、ほぼ均一な蛋白にまで精製し、さらに数個のsubunitからなることを推定した。

第四章 ペプチド結合生成反応の特異性

アミノ酸縮合酵素が各アミノアシル-sRNAに対し、特異性を有すると考えられるような実験結果は得られなかった。

一方、生物の種類による種特異性は非常にはっきりしている。表1に、絹糸腺、ラッテ肝および大腸菌より分離したそれぞれの酵素とリボソームの組合せによるとりこみを比較した。種特異

表1 APaseⅠおよびAPaseⅡの種特異性

リボソーム	絹糸腺 APase		ラッテ肝 APase		蛋白へのとりこみ(C.P.m.)
絹 糸 腺	I	—	—	—	217
	—	Ⅱ	—	—	60
	I	Ⅱ	—	—	1279
	—	—	I	—	18
	—	—	—	Ⅱ	36
	—	—	I	Ⅱ	559
	I	—	—	Ⅱ	1065
	I	—	I	—	222
	—	Ⅱ	I	—	531
	—	Ⅱ	—	Ⅱ	168
大 腸 菌	I	Ⅱ	—	—	3
	—	—	I	Ⅱ	4

性に関しては次のようなことが明らかとなった。

- ① 絹糸腺とラッテ肝は、酵素およびリボソームともに相互に組み合わせることが出来る。
- ② 絹糸腺APaseⅠはラッテ肝APaseⅠと、また絹糸腺APaseⅡはラッテ肝APaseⅡとそれぞれ代置し得る。
- ③ 絹糸腺およびラッテ肝の酵素は、大腸菌リボソームとはまったく組合わない。

以上のように、この反応の種特異性がアミノ酸縮合酵素とリボソームとの間に明確に見られたことは、両者が直接に接触し、はじめて反応が進行しうるものであることを暗示している。この点に関しては次章、リボソームと酵素の相互作用の項でさらに詳しく検討した。

また、本章においては、APase I および II と、蛋白合成の開始に関与する因子、リボソーム依存性の GTPase、すなわち、Lipmannらのいわゆる G 因子との関係についても検討した。

第五章 フィブロイン合成に必要な諸因子の相互作用

本章においては、フィブロイン合成に必須な、アミノアシル-sRNA, APase I, APase II, GTP, ポリソームおよび SH 化合物などの各々の因子が、どのような相互作用を行いつつペプチド結合の生成反応を行っているかという蛋白合成の最後の段階であり、最も重要な問題について検討した。

1) APase I とポリソームとの結合

APase I とポリソームとの結合を証明するため、はじめに遠心沈殿法を用いた。APase I とポリソームの混合液をポリソームのみが沈殿する蔗糖液中で遠心し、沈殿したポリソームの活性をしらべると、新たに APase I を加えなくとも反応が進行することが解った。この点をさらに確めるために、ミリポアフィルター法を用いた。APase I を絹糸腺ポリソームとともに 0℃ で 10 分間反応させた後、ミリポアフィルターでろ過し、そのろ液について APase I 活性を定量した結果を表 2 に示した。酵素を単独でろ過した場合は、約 80% くらいの活性がろ液に見られたが、ポリソームと酵素を反応させた後にろ過した場合は、ろ液にはほとんど APase I 活性

表 2 絹糸腺ポリソームに対する APase I の結合

試験番号	インキュベーション I *1	インキュベーション II *2	蛋白へのとりこみ (C.P. m.)
No. 1	ポリソーム + APase I	+ APase II	26
No. 2	— APase I	+ APase II	180
No. 3	ポリソーム	+ APase II	26
No. 4	—	+ APase I, APase II	240

*1 インキュベーション I は、ポリソーム, APase I, GTP, β -メルカプトエタノール, Tris 緩衝液 (pH 7.4) を含む。

*2 インキュベーション II は、ポリソーム, APase II, GTP, C^{14} -gly-SRNA および インキュベーション I の反応液をミリポアフィルターでろ過した液を含む。

は見られなかった。(表2 実験No. 1 と No. 2)。この結果は、APase I がポリソームに結合したためミリポアフィルターを通過しなかったものと解釈した。

以上に述べたごとく、ペプチド結合生成に先立ち、APase I とポリソームとの間にある種の複合体が形成されることを推定したが、次にGTPを介してAPase II とポリソームが相互作用を及ぼしている現象について述べる。

2) APase II, GTPおよびポリソームの複合体の生成

① APase II, GTPおよびポリソームを37℃5分間ブレインキュベートすると、その後の反応が促進された。

② APase II は N-ethylmaleimide (NEM) によって特異的に失活することが解ったが、あらかじめGTP, ポリソームおよびAPase II をブレインキュベートした後にNEMを加えると、APase II のNEMによる失活が保護された(表3)。

③, ②の現象はGTPの濃度に依存していた。

以上, ①, ②, ③の結果は、APase II とポリソームの複合体生成にGTPが関与していることを示す。

表3 APase II とポリソームの相互作用

試験 番号	ブレインキュベーション*						本インキュベーション*				蛋と 白り へこ のみ (CPM)
	ポリ ソ ー ム	APase II	GTP	NEM	* NEM	* β-メ ルカ ブト エタ ノール	APase I	APase II	GTP	C ¹⁴ - gly- SRNA	
1	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	208
2	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	248
3	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	92
4	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	119
5	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	242
6	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	298
7	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	88
8	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	192

試験番号1～4: ブレインキュベーション中にNEMが存在する条件でポリソーム, APase II およびGTPを反応

試験番号5～8: ポリソーム, APase II およびGTPをあらかじめ反応させた後にNEMを添加

*: おのおの37℃にて5分間反応

また、本章に於てはアミノアシル-sRNAのポリソームへの結合についても検討した。

第六章 総 括

以上、主としてカイコ後部絹糸腺組織を用い、フィブロイン合成の無細胞系の確立、その基本的諸性質、各因子の解析、さらに各因子の相互作用について研究した。

その結果、アミノアシル-sRNAから出発するフィブロイン合成系をはじめて確立することが出来た。さらにこの反応に関与するアミノ酸縮合酵素ⅠおよびⅡを精製し、酵素Ⅰについては現在もっとも純度の高いと考えられる標品を得た。これらの酵素はリボソームに対し顕著な種特異性を示し、GTPが両者の特異的結合に関与するものと推定した。

これらの結果および他の生物の蛋白合成研究の結果との比較においてフィブロイン合成の機作を論じた。

審 査 結 果 の 要 旨

蛋白質合成研究の主課題の一つは、無細胞系において活性の高い蛋白質合成系を確立し、反応機構を詳細に解析することにある。

本研究は、カイコの後部絹糸腺を材料として、無細胞系でのフィブロイン合成に必要な諸因子を解析し、その各々を精製した後、試験管内で再構成して蛋白合成反応を行わせ、それらの諸因子がそれぞれどのような機能を有するかを解明しようとして行われたものである。

著者はまず、後部絹糸腺の s RNA について検討し、アミノ酸に対する量的分布が、グリシン、アラニン、セリン、チロシンの順であり、s RNA の段階においてすでに合成される蛋白質のアミノ酸組成と相関関係にあることをはじめて明確にした。さらにアミノアシル-s RNA 生成の基本的条件を明らかにした。

ついでアミノアシル-s RNA より、ポリソーム上でフィブロインが生成する反応の研究に進み、この段階に関与する酵素をアミノ酸縮合酵素 (Amino Acid Polymerase) と命名し、その精製を試みた。精製の過程において、アミノ酸縮合酵素は2つの分画に分れることを発見した。この2つの酵素は、各単独ではアミノアシル-s RNA からのアミノ酸の蛋白へのとりこみを促進しないが、両者が同時に存在すると50%以上の効率で蛋白合成が行われることを明らかにし、アミノ酸縮合酵素ⅠおよびⅡと命名した。各酵素についてそれぞれ酵素化学的性質を検討し、酵素Ⅰは、分子量が約50万であり、ほぼ均一な蛋白質にまで精製し、さらに数個の subunit からなることを推定した。

アミノ酸縮合酵素は各アミノアシル-s RNA に対して、生物の種類およびアミノ酸の種類に関しては特異性は認められないが、アミノ酸縮合酵素とリボソームとの結合反応については、顕著な種特異性が認められた。たとえば、大腸菌のリボソームは、カイコのアミノ酸縮合酵素とは全く組合せることができない。このような明確な種特異性の存在は、蛋白合成反応の一つの特色と考えられ極めて興味深いものである。

さらにアミノ酸縮合酵素と、リボソーム、アミノアシル-s RNA、GTP などの相互反応を詳細に検討し、蛋白合成の場としてのポリソーム上でのこれら各因子の機能について可能なモデルを提出した。

以上、主としてカイコ後部絹糸腺組織を用い、フィブロイン合成の無細胞系の確立、その基本的諸性質、各因子の解析、さらに各因子の相互作用について研究し、多くの新しい事実を明らかにすることができた。これらの結果は、生化学の分野に貢献するところが大きく、著者に農学博士の学位を与えるに充分の価値あるものと認める。